



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/43442</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. November 1997 (20.11.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP97/02250</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 2. Mai 1997 (02.05.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 19 362.1      14. Mai 1996 (14.05.96)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SIFFERT, Winfried [DE/DE]; Schönleinstrasse 49, D-45147 Essen (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, BR, CA, CN, CZ, GE, HU, IL, JP, KR, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: USE OF A MUTATION IN THE GENE FOR HUMAN G-PROTEIN <math>\beta</math>3 SUB-UNIT FOR DIAGNOSING ILLNESSES</p> <p>(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINER GENVERÄNDERUNG IM GEN FÜR DIE HUMANE G-PROTEIN <math>\beta</math>3-UNTEREINHEIT ZUR DIAGNOSTIK VON ERKRANKUNGEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p style="padding-left: 20px;">The present invention relates to the use of a mutation in the gene for human G-protein <math>\beta</math>3 sub-unit for diagnosing illnesses.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p style="padding-left: 20px;">Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Genveränderung im Gen für humanes G-Protein <math>\beta</math>3-Untereinheit zur Diagnostik von Erkrankungen.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

VERWENDUNG EINER GENVERÄNDERUNG IM GEN FÜR DIE HUMANE G-PROTEIN  $\beta$ 3-UNTEREINHEIT  
ZUR DIAGNOSTIK VON ERKRANKUNGEN

## 5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostik von Erkrankungen mittels Genanalyse, insbesondere der Analyse von Genen für Untereinheiten der humanen Guaninnukleotid-bindenden  
10 Proteine (G-Proteine).

Heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) haben eine herausragende Bedeutung bei der intrazellulären Signaltransduktion. Sie vermitteln die Weiterleitung extrazellulärer  
15 Signale nach Stimulation von Hormonrezeptoren und anderen Rezeptoren, welche nach Rezeptoraktivierung eine Konformationsänderung durchmachen. Dies führt zur Aktivierung von G-Proteinen, welche nachfolgend intrazelluläre Effektoren (z.B. Ionenkanäle, Enzyme) aktivieren oder hemmen können. Heterotrimere G-Proteine sind aus  
20 drei Untereinheiten, den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten zusammengesetzt. Bislang wurden mehrere unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten, 5  $\beta$ -Untereinheiten und ca. 12  $\gamma$ -Untereinheiten mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden nachgewiesen (Birnbauer, L. and Birnbaumer, M. Signal transduction by G proteins:  
25 1994 edition. *J.Recept.Res.* 15:213-252, 1995; Offermanns, S. and Schultz, G. Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 350:329-338, 1994; Nürnberg, B., Gudermann, T., and Schultz, G. Receptors and G proteins as primary components of  
30 transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. *J.Mol.Med.* 73:123-132, 1995; Neer, E.J. Heterotrimeric G proteins: Organizers of Transmembrane Signals. *Cell* 80:249-257, 1995; Rens-Domiano, S. and Hamm, H.E. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J.*  
35 9:1059-1066, 1995).

Die rezeptorvermittelte Aktivierung bestimmter -Untereinheiten kann durch Vorbehandlung mit Pertussistoxin (PTX) gehemmt werden. Dazu gehören insbesondere die  $\alpha$ -Isoformen  $\alpha_{i1}$ ,  $\alpha_{i2}$  und  $\alpha_{i3}$ , sowie  
40 unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten. Solche G-Proteine werden auch als "PTX-sensitive G-Proteine" bezeichnet.

Es wurde gefunden, daß sich eine Genveränderung im Gen für humanes G-Protein  $\beta$ 3-Untereinheit zur Diagnostik von Erkrankungen eignet.  
45 gnet. Diese Genveränderung eignet sich insbesondere zur Ermitt-

lung des Risikos , an einer Krankheit, die mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, zu erkranken.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Ermittlung eines relativen Erkrankungsrisikos an mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheiten für einen Probanden, dadurch gekennzeichnet, daß man die Gensequenz für humanes G-Protein  $\beta 3$ -Untereinheit des Probanden mit der Gensequenz SEQ ID NO:1 vergleicht und für den Fall, daß an Position 825 ein Thymin (T) vorliegt, dem Probanden ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zuordnet.

Die gefundene Genveränderung befindet sich im Gen für humanes G-Protein  $\beta 3$ -Untereinheit. Dieses Gen ist von Levine et al. (Proc. Natl. Acad. Sci USA, Vol 87, Seite 2329-2333, (1990) beschrieben worden. Der codierende Bereich hat an Position 275 ein Ser-Codon (TCC), während Probanden mit erhöhtem Risiko für eine Erkrankung, die mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, an dieser Position das ebenfalls für Ser codierende Codon TCT besitzen. Die Genveränderung ist eine Basensubstitution an Position 825, bei der ein Cytosin (C) durch Thymin (T) ersetzt ist. Auf Aminosäureebene ist dieser Basenaustausch jedoch "stumm", d.h. er führt nicht zum Einbau einer anderen Aminosäure an dieser Position. Die bei Probanden mit erhöhtem Erkrankungsrisiko gefundene Sequenz ist in SEQ ID NO:1 im Sequenzprotokoll dargestellt.

Die gefundene Genveränderung tritt in der Regel in heterozygoter Form auf.

Unter Krankheiten, die mit einer G-Protein Fehlsteuerung assoziiert sind, sind solche Erkrankungen zu verstehen, bei denen das G-Protein in der Signaltransduktion involviert ist und seine Funktion nicht in physiologischer Weise erfüllt.

Die Fehlsteuerung kann eine Reihe von Ursachen haben, beispielsweise eine Veränderung im Strukturgen oder eine veränderte Genexpression.

Bei den Erkrankungen handelt es sich u.a. um Herz-Kreislauf Erkrankungen, Stoffwechselstörungen und Immunerkrankungen.

Als Herz-Kreislauf Erkrankungen sind zu nennen:

Hypertonie, Schwangerschaftshypertonie (Gestose, "hypertension in pregnancy"), koronare Herzkrankheit, lokalisierte und/oder generalisierte Atherosklerose, Stenosen der Blutgefäße, Restenose nach revaskularisierenden Gefäßeingriffen (z.B. PTCA mit und ohne

Stentimplantation), Apoplexneigung. Thromboseneigung und gesteigerte Thrombozytenaggregation.

Als Stoffwechselstörungen sind zu nennen:

5

Metabolisches Syndrom, Insulinresistenz und Hyperinsulinämie, Typ II-Diabetes mellitus, diabetische Komplikationen (z.B. Nephropathie, Neuropathie, Retinopathie, etc.) Fettstoffwechselstörungen, gestörte zentrale Chemorezeption (CO<sub>2</sub>-Toleranz, Azidosetoleranz, 10 plötzlicher Kindstod (SIDS)).

Als Immunerkrankungen sind zu nennen:

Gestörte Stärke der körpereigenen Immunantwort (Bildung von Immunoglobulinen, Aggressivität von T-Zellen und NK-Zellen), gestörte generelle Proliferationsneigung inkl. Wundheilungsvermögen, Neigung zur Tumorentstehung und Proliferation inkl. Metastasierungspotential maligne transformierter Zellen, Dauer der Latenzzeit nach HIV-Infektion bis zum klinischen Ausbruch der Erkrankung, Kaposi-Sarkom, Neigung zu Leberzirrhose, Transplantatol- 20 leranz und Transplantatabstoßung.

Die erfindungsgemäße Verwendung der Genmutation eignet sich besonders zur Ermittlung des Erkrankungsrisikos an Hypertonie.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herstellung von transgenen Tieren, die die oben beschriebene Genmutation tragen. Solche transgenen Tiere sind vor allem als Tiermodelle für die Untersuchung und Therapie der oben beschriebenen Krankheiten von großer Bedeutung. Die Verfahren zur Erzeugung transgener Tiere 30 sind dem Fachmann allgemein bekannt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Ermittlung des relativen Erkrankungsrisikos wird einem Probanden Körpermaterial entnommen, 35 das die genetische Information des Probanden enthält. Dies wird in der Regel durch Blutentnahme und Isolierung der Nukleinsäure hieraus erreicht.

Aus der isolierten Nukleinsäure des Probanden wird die Genstruktur für das G-Protein  $\beta 3$ -Untereinheit ermittelt und mit der in SEQ ID NO:1 angegebenen Sequenz verglichen. 40

Die Ermittlung der Genstruktur kann durch Sequenzierung der Nukleinsäure erfolgen. Dies kann entweder direkt aus der genomischen DNA oder nach Amplifizierung der Nukleinsäure 45 beispielsweise mittels PCR-Technik erfolgen.

Die Genstruktur kann auf genomischer Ebene oder auch auf mRNA oder cDNA Ebene erfolgen.

Bevorzugt ist die Ermittlung durch Sequenzierung nach PCR-Amplifikation der cDNA. Die für die PCR-Reaktion geeigneten Primer lassen sich für den Fachmann leicht aus den in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenzen ableiten. Man verfährt dabei vorteilhafterweise so, daß jeweils ein Strang und Gegenstrang bindender Primer vor und nach der relevanten Basenposition 825 gewählt wird.

10

Der Genvergleich kann jedoch auch mit anderen Methoden, beispielsweise durch selektive Hybridisierung oder durch entsprechende Kartierung mit Restriktionsenzymen durchgeführt werden. Der Basenaustausch C→T an der oben beschriebenen Position 825 führt zum Verlust einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym Dsa I, was ebenfalls dem Nachweis dieses genetischen Polymorphismus dient.

Wenn der Proband an der Position 825 ein Thymin (T) trägt, ist ihm ein höheres Erkrankungsrisiko zuzuordnen als einem Probanden mit einem Cytosin (C) an dieser Position.

Die Erfindung ist in den folgenden Beispielen weiter veranschaulicht.

25

#### Beispiel 1

Nachweis der Genveränderung bei Hypertonikern durch Sequenzierung

30 In Voruntersuchungen konnte eine gesteigerte Aktivierbarkeit PTX-sensitiver G-Proteine bei Patienten mit essentieller Hypertonie nachgewiesen werden. Dieser Nachweis gelang in immortalisierten Zellen solcher Patienten, die als phänotypischen Marker eine gesteigerte Aktivität des Na/H- Austauschers aufweisen. Die gesteigerte Aktivierbarkeit PTX-sensitiver G-Proteine hat wichtige Konsequenzen für die Zellfunktion. Dazu gehören eine gesteigerte Bildung intrazellulärer "second messenger" - Moleküle (z.B. Inositol-1,4,5-trisphosphat), eine gesteigerte Freisetzung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen, eine vermehrte Bildung von Immunglobulinen und ein beschleunigtes Zellwachstum. Da diese Veränderungen in immortalisierten Zellen und nach langer Zellkulturdauer nachzuweisen sind, kann man davon ausgehen, daß diese Veränderung genetisch fixiert ist (Roszkopf, D., Frömter, E., and Siffert, W. Hypertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immortalized lymphoblasts from essential hypertensive patients-a cell culture model for human hypertension. *J.Clin.Invest.* 92:2553-2559, 1993; Roszkopf, D., Hartung, K., Hense, J., and

Siffert, W. Enhanced immunoglobulin formation of immortalized B cells from hypertensive patients. *Hypertension* 26:432-435, 1995; Rosskopf, D., Schröder, K.-J., and Siffert, W. Role of sodium-hydrogen exchange in the proliferation of immortalised lymphoblasts from patients with essential hypertension and normotensive subjects. *Cardiovasc.Res.* 29:254-259, 1995; Siffert, W., Rosskopf, D., Moritz, A., Wieland, T., Kaldenberg-Stasch, S., Kettler, N., Hartung, K., Beckmann, S., and Jakobs, K.H. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J.Clin.Invest.* 96:759-766, 1995).

Aus immortalisierten Zelllinien von Hypertonikern wurde nach Standardverfahren RNS präpariert und mittels der reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die für die G-Proteinuntereinheit G3 kodierende cDNS amplifiziert und sequenziert. Für die PCR-Reaktion wurden die folgenden Oligonukleotid-Primer eingesetzt:

5'-TGG GGG AGA TGG AGC AAC TG und  
20 5'-CTG CTG AGT GTG TTC ACT GCC.

Im Vergleich zu der von Levine et al. publizierten Sequenz (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T., Jr., Helman, L.J., and Ahn, T.G. *Molecular cloning of  $\beta_3$  subunit, a third form of the G protein  $\beta$ -subunit polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(6):2329-2333, 1990) wurde in der cDNS aus Hypertonikerzellen die folgende Abweichung gefunden: Nukleotid 825 Cytosin (C) im Bereich der kodierenden Sequenz wird durch ein Thymin (T) ersetzt (Nukleotid 1 entspricht der Base A des Startcodons ATG).

30 Dieser Basenaustausch führt zu einem stummen Polymorphismus, d.h. die durch das entsprechende Basentriplett kodierte Aminosäure (Serin) wird gegenüber der Originalsequenz nicht verändert. Die gefundene DNA-Sequenz ist in SEQ ID NO:1 beschrieben.

## 35 Beispiel 2

Nachweis der Genveränderung bei Hypertonikern durch Restriktionsenzym-Analyse

40 In der Abbildung ist ein Genvergleich von Normotonikern und Hypertonikern durch Restriktionsenzymanalyse dargestellt. Hier wurde die mittels PCR amplifizierte, für G3 kodierende cDNS aus Zellen von Normotonikern (NT) und Hypertonikern (HT) einer Restriktionsenzymanalyse mit dem Enzym Dsa I unterzogen. Die Reaktionsprodukte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, was in der

45 Abbildung dargestellt ist.

Man erkennt in der Abbildung deutlich die vollständige Restriktion der G3 cDNS aus Normotonikerzellen nach Verdau mit Dsa I. Die cDNS aus Hypertonikerzellen wird nur teilweise durch Dsa I geschnitten. Neben den zu erwartenden Schnittprodukten ergibt sich zudem ungeschnittenes PCR-Produkt. Links und rechts sind Referenzfragmente (Marker) zum Größenvergleich aufgetragen. Vier von fünf der hier dargestellten DNA-Sequenzen von Hypertonikern zeigen den oben beschriebenen Basenaustausch und sind für diese Veränderung heterozygot.

10

15

20

25

30

35

40

45



## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056
- (G) TELEPHON: 0621/6048526
- (H) TELEFAX: 0621/6043123
- (I) TELEX: 1762175170

(ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Diagnostik von Krankheiten  
mittels Genanalyse

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1517 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..1024

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG GGG GAG ATG GAG CAA CTG CGT CAG GAA GCG GAG CAG CTC AAG AAG	48
Met Gly Glu Met Glu Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Lys Lys	
1 5 10 15	
CAG ATT GCA GAT GCC AGG AAA GCC TGT GCT GAC GTT ACT CTG GCA GAG	96
Gln Ile Ala Asp Ala Arg Lys Ala Cys Ala Asp Val Thr Leu Ala Glu	
20 25 30	
CTG GTG TCT GGC CTA GAG GTG GTG GGA CGA GTC CAG ATG CGG ACG CGG	144
Leu Val Ser Gly Leu Glu Val Val Gly Arg Val Gln Met Arg Thr Arg	
35 40 45	
CGG ACG TTA AGG GGA CAC CTG GCC AAG ATT TAC GCC ATG CAC TGG GCC	192
Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Ala	
50 55 60	
ACT GAT TCT AAG CTG CTG GTA AGT GCC TCG CAA GAT GGG AAG CTG ATC	240
Thr Asp Ser Lys Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile	
65 70 75 80	
GTG TGG GAC AGC TAC ACC ACC AAC AAG GTG CAC GCC ATC CCA CTG CGC	288
Val Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Val His Ala Ile Pro Leu Arg	
85 90 95	
TCC TCC TGG GTC ATG ACC TGT GCC TAT GCC CCA TCA GGG AAC TTT GTG	336
Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Phe Val	

100															105					110					
GCA	TGT	GGG	GGG	CTG	GAC	AAC	ATG	TGT	TCC	ATC	TAC	AAC	CTC	AAA	TCC	384									
Ala	Cys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Met	Cys	Ser	Ile	Tyr	Asn	Leu	Lys	Ser										
115															120					125					
CGT	GAG	GGC	AAT	GTC	AAG	GTC	AGC	CGG	GAG	CTT	TCT	GCT	CAC	ACA	GGT	432									
Arg	Glu	Gly	Asn	Val	Lys	Val	Ser	Arg	Glu	Leu	Ser	Ala	His	Thr	Gly										
130															135					140					
TAT	CTC	TCC	TGC	TGC	CGC	TTC	CTG	GAT	GAC	AAC	AAT	ATT	GTG	ACC	AGC	480									
Tyr	Leu	Ser	Cys	Cys	Arg	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Asn	Ile	Val	Thr	Ser										
145															150					155					160
TCG	GGG	GAC	ACC	ACG	TGT	GCC	TTG	TGG	GAC	ATT	GAG	ACT	GGG	CAG	CAG	528									
Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Cys	Ala	Leu	Trp	Asp	Ile	Glu	Thr	Gly	Gln	Gln										
165															170					175					
AAG	ACT	GTA	TTT	GTG	GGA	CAC	ACG	GGT	GAC	TGC	ATG	AGC	CTG	GCT	GTG	576									
Lys	Thr	Val	Phe	Val	Gly	His	Thr	Gly	Asp	Cys	Met	Ser	Leu	Ala	Val										
180															185					190					
TCT	CCT	GAC	TTC	AAT	CTC	TTC	ATT	TCG	GGG	GCC	TGT	GAT	GCC	AGT	GCC	624									
Ser	Pro	Asp	Phe	Asn	Leu	Phe	Ile	Ser	Gly	Ala	Cys	Asp	Ala	Ser	Ala										
195															200					205					
AAG	CTC	TGG	GAT	GTG	CGA	GAG	GGG	ACC	TGC	CGT	CAG	ACT	TTC	ACT	GGC	672									
Lys	Leu	Trp	Asp	Val	Arg	Glu	Gly	Thr	Cys	Arg	Gln	Thr	Phe	Thr	Gly										
210															215					220					
CAC	GAG	TCG	GAC	ATC	AAC	GCC	ATC	TGT	TTC	TTC	CCC	AAT	GGA	GAG	GCC	720									
His	Glu	Ser	Asp	Ile	Asn	Ala	Ile	Cys	Phe	Phe	Pro	Asn	Gly	Glu	Ala										
225															230					235					240
ATC	TGC	ACG	GGC	TCG	GAT	GAC	GCT	TCC	TGC	CGC	TTG	TTT	GAC	CTG	CGG	768									
Ile	Cys	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Ala	Ser	Cys	Arg	Leu	Phe	Asp	Leu	Arg										
245															250					255					
GCA	GAC	CAG	GAG	CTG	ATC	TGC	TTC	TCC	CAC	GAG	AGC	ATC	ATC	TGC	GGC	816									
Ala	Asp	Gln	Glu	Leu	Ile	Cys	Phe	Ser	His	Glu	Ser	Ile	Ile	Cys	Gly										
260															265					270					
ATC	ACG	TCT	GTG	GCC	TTC	TCC	CTC	AGT	GGC	CGC	CTA	CTA	TTC	GCT	GGC	864									
Ile	Thr	Ser	Val	Ala	Phe	Ser	Leu	Ser	Gly	Arg	Leu	Leu	Phe	Ala	Gly										
275															280					285					
TAC	GAC	GAC	TTC	AAC	TGC	AAT	GTC	TGG	GAC	TCC	ATG	AAG	TCT	GAG	CGT	912									
Tyr	Asp	Asp	Phe	Asn	Cys	Asn	Val	Trp	Asp	Ser	Met	Lys	Ser	Glu	Arg										
290															295					300					
GTG	GGC	ATC	CTC	TCT	GGC	CAC	GAT	AAC	AGG	GTG	AGC	TGC	CTG	GGA	GTC	960									
Val	Gly	Ile	Leu	Ser	Gly	His	Asp	Asn	Arg	Val	Ser	Cys	Leu	Gly	Val										
305															310					315					320
ACA	GCT	GAC	GGG	ATG	GCT	GTG	GCC	ACA	GGT	TCC	TGG	GAC	AGC	TTC	CTC	1008									
Thr	Ala	Asp	Gly	Met	Ala	Val	Ala	Thr	Gly	Ser	Trp	Asp	Ser	Phe	Leu										
325															330					335					
AAA	ATC	TGG	AAC	TGA	G	GAGGCTGGAG	AAAGGGAAGT	GGAAGGCAGT	GAACACACTC							1064									
Lys	Ile	Trp	Asn	*																					
340																									
AGCAGCCCCC	TGCCCCGACCC	CATCTCATTC	AGGTGTTCTC	TTCTATATTC	CGGGTGCCAT											1124									
TCCCACTAAG	CTTCTCCTT	TGAGGGCAGT	GGGGAGCATG	GGACTGTGCC	TTTGGGAGGC											1184									
AGCATCAGGG	ACACAGGGGC	AAAGAAGTGC	CCCATCTCCT	CCCATGGCCT	TCCCTCCCCA											1244									
CAGTCCTCAC	AGCCTCTCCC	TTAATGAGCA	AGGACAACCT	GCCCCCTCCC	AGCCCTTTGC											1304									
AGGCCCAGCA	GACTTGAGTC	TGAGGCCCCA	GGCCCTAGGA	TTCCTCCCCC	AGAGCCACTA											1364									
CCTTTGTCCA	GGCCTGGGTG	GTATAGGGCG	TTTGGCCCTG	TGACTATGGC	TCTGGCACCA											1424									
CTAGGCTCCT	GGCCCTCTTC	TTATTTCATG	TTTCTCCTTT	TTCTACCTTT	TTTTCTCTCC											1484									
TAAGGACACCT	GCAATAAAGT	GTAGCACCCT	GGT													1517									

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 341 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Gly	Glu	Met	Glu	Gln	Leu	Arg	Gln	Glu	Ala	Glu	Gln	Leu	Lys	Lys	1	5	10	15
Gln	Ile	Ala	Asp	Ala	Arg	Lys	Ala	Cys	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Ala	Glu	20	25	30	
Leu	Val	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Val	Gly	Arg	Val	Gln	Met	Arg	Thr	Arg	35	40	45	
Arg	Thr	Leu	Arg	Gly	His	Leu	Ala	Lys	Ile	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Ala	50	55	60	
Thr	Asp	Ser	Lys	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Leu	Ile	65	70	75	80
Val	Trp	Asp	Ser	Tyr	Thr	Thr	Asn	Lys	Val	His	Ala	Ile	Pro	Leu	Arg	85	90	95	
Ser	Ser	Trp	Val	Met	Thr	Cys	Ala	Tyr	Ala	Pro	Ser	Gly	Asn	Phe	Val	100	105	110	
Ala	Cys	Gly	Gly	Leu	Asp	Asn	Met	Cys	Ser	Ile	Tyr	Asn	Leu	Lys	Ser	115	120	125	
Arg	Glu	Gly	Asn	Val	Lys	Val	Ser	Arg	Glu	Leu	Ser	Ala	His	Thr	Gly	130	135	140	
Tyr	Leu	Ser	Cys	Cys	Arg	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Ile	Val	Thr	Ser		145	150	155	160
Ser	Gly	Asp	Thr	Thr	Cys	Ala	Leu	Trp	Asp	Ile	Glu	Thr	Gly	Gln	Gln	165	170	175	
Lys	Thr	Val	Phe	Val	Gly	His	Thr	Gly	Asp	Cys	Met	Ser	Leu	Ala	Val	180	185	190	
Ser	Pro	Asp	Phe	Asn	Leu	Phe	Ile	Ser	Gly	Ala	Cys	Asp	Ala	Ser	Ala	195	200	205	
Lys	Leu	Trp	Asp	Val	Arg	Glu	Gly	Thr	Cys	Arg	Gln	Thr	Phe	Thr	Gly	210	215	220	
His	Glu	Ser	Asp	Ile	Asn	Ala	Ile	Cys	Phe	Phe	Pro	Asn	Gly	Glu	Ala	225	230	235	240
Ile	Cys	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Ala	Ser	Cys	Arg	Leu	Phe	Asp	Leu	Arg	245	250	255	
Ala	Asp	Gln	Glu	Leu	Ile	Cys	Phe	Ser	His	Glu	Ser	Ile	Ile	Cys	Gly	260	265	270	
Ile	Thr	Ser	Val	Ala	Phe	Ser	Leu	Ser	Gly	Arg	Leu	Leu	Phe	Ala	Gly	275	280	285	
Tyr	Asp	Asp	Phe	Asn	Cys	Asn	Val	Trp	Asp	Ser	Met	Lys	Ser	Glu	Arg	290	295	300	
Val	Gly	Ile	Leu	Ser	Gly	His	Asp	Asn	Arg	Val	Ser	Cys	Leu	Gly	Val	305	310	315	320
Thr	Ala	Asp	Gly	Met	Ala	Val	Ala	Thr	Gly	Ser	Trp	Asp	Ser	Phe	Leu	325	330	335	
Lys	Ile	Trp	Asn	*												340			

## Patentansprüche

1. Verwendung einer Genveränderung im Gen für humanes G-Protein  
5  $\beta$ 3-Untereinheit zur Diagnostik von Erkrankungen.
2. Verwendung einer Genveränderung im Gen für humanes G-Protein  
 $\beta$ 3-Untereinheit zur Ermittlung des Risikos , an einer Krank-  
heit, die mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, zu er-  
10 kranken.
3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die  
Genveränderung im Codon für die Aminosäure 275 in SEQ ID NO:1  
liegt.  
15
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß an  
Position 825 in SEQ ID NO:1 eine Substitution von Cytosin  
durch Thymin vorliegt.
- 20 5. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die  
Krankheit eine Herz-Kreislauf-Erkrankung, eine Stoffwechsel-  
störung oder eine Immunerkrankung ist.
6. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die  
25 Krankheit Hypertonie ist.
7. Verfahren zur Ermittlung eines relativen Erkrankungsrisikos  
an mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheiten für  
einen Probanden, dadurch gekennzeichnet, daß man die Gense-  
quenz für humanes G-Protein  $\beta$ 3-Untereinheit des Probanden mit  
30 der Gensequenz SEQ ID NO:1 vergleicht und für den Fall, daß  
an Position 825 ein Thymin (T) vorliegt, dem Probanden ein  
erhöhtes Erkrankungsrisiko zuordnet.
- 35 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der  
Genvergleich durch Sequenzierung vorgenommen wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß vor  
der Sequenzierung ein Genabschnitt, der Position 825 beinhal-  
40 tet, amplifiziert wird.
10. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß daß  
der Genvergleich durch Hybridisierung durchgeführt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Genvergleich durch Spaltung mittels Restriktionsenzymen durchgeführt wird.
- 5 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Restriktionsenzym Dsa I verwendet wird.

10

15

20

25

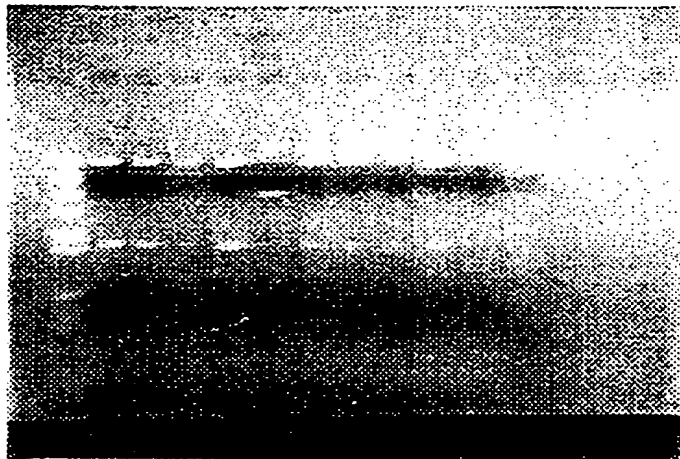
30

35

40

45

NT NT NT NT HT HT HT HT HT



ERSATZBLATT (REGEL 26)

BEST AVAILABLE COPY

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/EP 97/02250

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	COTTON R G H: "CURRENT METHODS OF MUTATION DETECTION" MUTATION RESEARCH, vol. 285, 1 January 1993, pages 125-144, XP000443992 see the whole document	1-12
A	LEVINE ET AL.: "MOLECULAR CLONING OF BETA3 SUBUNIT, A THIRD FORM OF THE G PROTEIN BETA-SUBUNIT POLYPEPTIDE" PROC. NATL. ACAD. SCI. , vol. 87, 1990, pages 2329-2333, XP002041163 cited in the application see the whole document	1-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 September 1997

Date of mailing of the international search report

01.10.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hagenmaier, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No  
PCT/EP 97/02250

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SIFFERT ET AL.: "ENHANCED G PROTEIN ACTIVATION IN IMMORTALIZED LYMPHOBLASTS FROM PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION" J. CLIN. INVEST., vol. 96, 1995, pages 759-766, XP002041164 see the whole document -----</p>	1-12



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat es Aktenzeichen  
PCT/EP 97/02250

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	COTTON R G H: "CURRENT METHODS OF MUTATION DETECTION" MUTATION RESEARCH, Bd. 285, 1. Januar 1993, Seiten 125-144, XP000443992 siehe das ganze Dokument ---	1-12
A	LEVINE ET AL.: "MOLECULAR CLONING OF BETA3 SUBUNIT, A THIRD FORM OF THE G PROTEIN BETA-SUBUNIT POLYPEPTIDE" PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 87, 1990, Seiten 2329-2333, XP002041163 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-12

-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. September 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01.10.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hagenmaier, S

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 97/02250

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SIFFERT ET AL.: "ENHANCED G PROTEIN ACTIVATION IN IMMORTALIZED LYMPHOBLASTS FROM PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION" J. CLIN. INVEST., Bd. 96, 1995, Seiten 759-766, XP002041164 siehe das ganze Dokument -----</p>	1-12